



Docket No. 17P29US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

DHL EXPRESS 552 6567 760

In the application of: Antje Reinstorf et al.
Serial Number: 10/711,619
Filing Date: 9/29/2004
Title: Modified Calcium Phosphate Bone Cement

**Commissioner for Patents
Alexandria, VA 22313-1450**

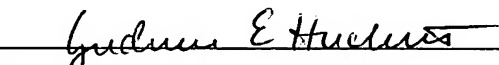
REQUEST TO GRANT PRIORITY DATE

Pursuant to 35 USC 119 and 37 CFR 1.55, applicant herewith claims priority of the following **German** patent application(s):

20 2004 005420.5 filed 3/31/2004.

A certified copy of the priority document is enclosed.

Respectfully submitted December 21, 2004,



Ms. Gudrun E. Hockett, Ph.D.
Patent Agent, Reg. No. 35,747
Lönsstr. 53
42289 Wuppertal
GERMANY
Telephone: +49-202-257-0371
Telefax: +49-202-257-0372
gudrun.draudt@t-online.de

GEH/Enclosure: German priority document(s) DE202004005420.5



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Gebrauchsmusteranmeldung

Aktenzeichen: 20 2004 005420.5

Anmeldetag: 31. März 2004

Anmelder/Inhaber: Technische Universität Dresden, 01062 Dresden/DE

Bezeichnung: Modifizierter Calciumphosphatzement

IPC: A 61 L 24/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Gebrauchsmusteranmeldung.

München, den 29. Oktober 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Letang

Modifizierter Calciumphosphatzement

Die Erfindung betrifft einen modifizierten Calciumphosphatzement für die Anwendung in der Medizin (Chirurgie), der als Material zur Auffüllung von Knochendefekten (als temporärer Knochenersatz) und für das Einbetten kleinerer Implantate geeignet ist.

An der Entwicklung von Calciumphosphatzementen (CPBC) wird seit den 80er Jahren gearbeitet. Es existieren zahlreiche Gemische verschiedener Calciumphosphatphasen, die mit Flüssigkeit zu einer Paste verarbeitet werden können und so für die Füllung von Knochendefekten einsetzbar sind. Die Knochenzemente härten im Körper aus. Dabei werden die Ausgangsphasen innerhalb weniger Tage zu einem knochenähnlichen calciumdefizienten Hydroxylapatit (CDHAP) umgewandelt. Dieser „synthetische“ CDHAP wird im Laufe der Zeit durch körpereigenen Knochen ersetzt. Dies ist durch die Stoffwechselaktivität der Zellen des umgebenden Gewebes realisiert.

Ein großes Einsatzgebiet der CPBC ist der Mund-Kiefer-Gesichtsbereich. Hier werden oft große Drücke aufgebaut, wodurch eine ausreichend hohe Festigkeit des CPBC unbedingt erforderlich ist. Weiterhin ist eine hohe spezifische Oberfläche wünschenswert, um eine schnelle Bedeckung mit einer Vielzahl zellaktivierenden Substanzen des Blutserums zu ermöglichen. Eine Umsetzung des Ausgangsmaterials der Zementmischung bei nur geringer Änderung der Ionenkonzentration (Protonen/pH, Calciumionen, Phosphationen) des umgebenden Mediums ist für eine Zellbesiedelung essentiell.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Calciumphosphatzementmischung in der Weise zu modifizieren, daß dies zu einem Material führt, das möglichst

- eine erhöhte Festigkeit,
 - eine größere spezifische Oberfläche, und
 - eine verbesserte Zell –und Gewebeverträglichkeit
- aufweist.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch einen modifizierten Calciumphosphatzement auf Basis Tricalciumphosphat, Dicalciumphosphat (wasserfrei), Calciumcarbonat und gefälltem Hydroxylapatit, wobei der Calciumphosphatzement einen organischen Phosphatester der Orthophosphorsäure, vorzugsweise einen Monophosphatester, oder ein Salz eines solchen organischen Phosphatesters enthält.

Die Ausgangsmischung des Calciumphosphatzements enthält bevorzugt 50 bis 65 Masse-%, besonders bevorzugt 58 Masse-%, alpha-Tricalciumphosphat (TCP), bevorzugt 20 bis 30 Masse-%, besonders bevorzugt 24 Masse-%, wasserfreies Dicalciumphosphat (DCPA), bevorzugt 5 bis 12 Masse-%, besonders bevorzugt 8,5 Masse-%, Calciumcarbonat (CC) und bevorzugt 5 bis 12 Masse-%, besonders bevorzugt 8,5 Masse-%, gefällten Hydroxylapatit (PHAP).

Dieser Ausgangsmischung werden bevorzugt bis zu 5 Masse-%, besonders bevorzugt 1 bis 2,5 Masse-%, mineralisiertes Kollagen I beigelegt.

Nach sorgfältiger Mischung des Pulvers mit einer bestimmten Menge einer wässrigen Dinatriumhydrogenphosphatlösung kann das Produkt pastös weiterverarbeitet werden. Diese Zementmischung bindet *in vivo* oder in Flüssigkeit innerhalb von 4 Tagen zu einem carbonathaltigen CDHAP ab.

Erfindungsgemäß kann durch die Zumischung eines organischen Phosphatesters der Orthophosphorsäure, wie z. B. Phosphoserin (PS) oder Glycerophosphat (GP), zur oben beschriebenen Calciumphosphatzementmischung eine Verbesserung der Druckstabilität von bis zu 50% und eine Vergrößerung der spezifischen Oberfläche auf das bis zu 1,5 fache des Zements ohne Zumischung eines organischen Phosphatesters erreicht werden.

Der organische Phosphatester der Orthophosphorsäure, bevorzugt Phosphoserin (PS) oder Glycerophosphat (GP), wird vorzugsweise in 0,5 bis 5 Masse-%, besonders bevorzugt weniger als 3 Masse-%, zugegeben.

In besonderen Ausführungsformen der Erfindung werden anstelle des PS oder des GP andere organische Ester der Orthophosphorsäure, wie Phosphothreonin, und Phosphotyrosin, oder Ester anderer mehrwertiger Alkohole eingesetzt. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird als Ausgangsmischung ein anderer Calciumphosphatzement eingesetzt, der als Hauptbestandteil (bevorzugt 50 bis 65 Masse-%) alpha-TCP enthält und zu CDHAP abbindet.

Vorteile der Erfindung sind:

- eine deutliche Erhöhung der Festigkeit des abgebundenen Zementes,
- eine Erhöhung der spezifischen Oberfläche,
- eine Verfeinerung des Gefüges,
- die initiale Aushärtezeit der Zementpaste (bestimmt nach ASTM 266-99) ist über das Verhältnis Menge der Ausgangsmischung zu zugegebener Flüssigkeitsmenge in optimaler Weise variierbar,
- die Zementmischung weist keine unphysiologischen Schwankungen der Ionenkonzentration (pH, Ca, P) während des Abbindeprozesses auf,
- eine Verbesserung der Knochenzellaktivität.

Anhand nachfolgender Ausführungsbeispiele wird die Erfindung näher erläutert.

In den Beispielen werden folgende Abkürzungen verwendet:

l/p-Verhältnis = Verhältnis der eingesetzten Masse Flüssigkeit bezogen auf die Masse Pulver
D = Druckfestigkeit in MPa nach 100h Abbinden in simulierter Körperflüssigkeit
SBF = simulierte Körperflüssigkeit
Asp (d) = spezifische Oberfläche in m^2/g nach d- Tagen des Abbindens in SBF

Die verwendete SBF ist eine wässrige Lösung folgender Salze:

150 mMol/l NaCl; 90 mMol/l NaHCO_3 ; 1 mMol/l MgSO_4 ; 1 mMol/l NaH_2PO_4 ; 5 mMol/l KCl; 1,8 mMol/l CaCl_2 , pH=7,4.

Ausführungsbeispiel 1:

Als Basiszement für einen Glycerolphosphat-haltigen Knochenzement wird Calcibon[®], ein Calciumphosphatzement der Firma BIOMET Merck Biomaterials GmbH verwendet. Zu 1000 mg dieses Basiszementes werden 34,6 mg β -Glycerophosphat (Natriumsalz; Molmasse 216 g/mol) (G1) bzw. 69,2 mg β -Glycerophosphat (Natriumsalz; Molmasse 216 g/mol) (G2) zugemischt und entsprechend sorgfältig vermengt. Zum Vergleich wird Calcibon[®] ohne weitere Zusätze angemischt (G0).

Die Mischungen (G0, G1 und G2) werden jeweils mit einem l/p-Verhältnis von 0,28 angemischt, wobei eine 4%ige wäßrige Dinatriumhydrogenphosphatlösung verwendet wird. Anschließend werden die pastösen Zementmischungen je nach weiterer Verwendung geformt.

Zur Bestimmung der Druckfestigkeit werden zylindrische Körper (Durchmesser 10 mm, Höhe 8 mm) vorbereitet. Diese werden in ca. 5 ml SBF-Lösung gegeben und bei 37°C genau 100 h abgebunden. Mit einer Werkstoffprüfmaschine -Instron 5566- wird die kritische Druckkraft bestimmt, welche bezogen auf die Fläche des Probekörpers die Druckfestigkeit des Materials angibt.

In Fig. 1 sind die für die Beispiele G1 (34,6 mg GP) und G2 (69,2 mg GP) ermittelten Druckfestigkeiten im Vergleich zum Zement ohne Einmischung (G0) dargestellt. Dabei wird eine signifikante Erhöhung der Festigkeit mit Zunahme des Glycerophosphatanteils deutlich.

Die Ergebnisse der für die Ausführungsbeispiele G1 und G2 und den Vergleichsversuch G0 ermittelten Werte für Druckfestigkeit (D) werden in der folgenden Tabelle (Tabelle 1) zusammengefasst:

Tabelle 1:

	G0	G1	G2
β-Glycerophosphat [/g Zement]	-	34,6 mg	69,2 mg
D [MPa]	41,0 ± 3,4	52,1 ± 7,7	55,2 ± 5,5

Die Ionenkonzentrationen in der den Zement umgebenden Lösung wurde bestimmt, indem während des Abbindeprozesses regelmäßig Proben der Lösung entnommen und bezüglich des pH-Wertes (Glaselektrode), Calcium- und Phosphatgehaltes (photometrische Methode) analysiert wurden. Es wurden keine Abweichungen in zell- und gewebeschädigende pH-Bereiche (pH<7 und pH>8) gemessen. Die ermittelten Calcium- und Phosphationenkonzentrationen lagen ebenfalls auf für Zellen und Gewebe gut verträglichen Niveaus.

Ausführungsbeispiel 2:

Als Basiszement für einen Phosphoserin- und Kollagen-I-haltigen Knochenzement wird Calcibon®, ein Calciumphosphatzement der Firma BIOMET Merck Biomaterials GmbH verwendet. Einer Menge von 975 mg dieses Basiszements werden 25 mg mineralisiertes Kollagen I beigelegt. Nach sorgfältiger Homogenisierung werden 2 mg O-Phospho-L-serin

(A1) bzw. 10 mg O-Phospho-L-serin (A2) bzw. 25 mg O-Phospho-L-serin (A3) bzw. 50 mg O-Phospho-L-serin (A4) zugefügt und entsprechend sorgfältig gemischt. In einer Vergleichsprobe (A0) wird kein O-Phospho-L-serin zugefügt. Die Mischungen (A0 bis A4) werden jeweils mit einem l/p-Verhältnis von 0,42 angemischt, wobei eine 4%ige wässrige Dinatriumhydrogenphosphatlösung verwendet wird. Anschließend werden die pastösen Zementmischungen je nach weiterer Verwendung geformt.

Für die Bestimmung der Druckfestigkeit werden zylindrische Körper (Durchmesser 10 mm, Höhe 8 mm) vorbereitet. Diese werden in ca. 5 ml SBF-Lösung gegeben und bei 37°C genau 100 h abgebunden. Mit einer Werkstoffprüfmaschine -Instron 5566- wird die kritische Druckkraft bestimmt, welche bezogen auf die Fläche des Probekörpers die Druckfestigkeit des Materials angibt.

Für die Ermittlung der spezifischen Oberfläche wurden die Proben, die nach A1 bis A4 hergestellt wurden, zerkleinert und die spezifische Oberfläche der trockenen Proben durch N₂-Adsorption nach der BET-Methode bestimmt. Dazu wurde das Oberflächenbestimmungsgerät ASAP 2010 verwendet.

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2) sind die beschriebenen Ausführungsbeispiele und die ermittelten Werte für die Druckfestigkeit (D) und die spezifische BET- Oberfläche (Asp) zusammengefasst:

Tabelle 2:

	A0	A1	A2	A3	A4
Phosphoserin [g Zement]	-	2 mg	10 mg	25 mg	50 mg
D [MPa]	28,4 ± 0,3	31,9 ± 2,8	34,4 ± 3,7	41,7 ± 2,9	41,7 ± 3,4
Asp (4) [m ² /g]	51,79 ± 0,2	68,7 ± 0,3	77,9 ± 0,3	76,95 ± 0,2	37,39 ± 0,2
Asp (30) [m ² /g]					71,07 ± 0,2

In Fig. 2 sind die für die Proben mit 2 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg Phosphoserin-Beimischung pro g Zement (Beispiele A1 bis A4) ermittelten Druckfestigkeiten im Vergleich zu dem entsprechenden Zement (mit Kollagen I) ohne Phosphoserin-Beimischung (A0) dargestellt. Dabei wird eine signifikante Erhöhung der Festigkeit mit Zunahme des Phosphoserinanteils deutlich (siehe auch Tabelle 2).

In Fig. 3 sind die ermittelten BET-Oberflächen in Abhängigkeit vom Phosphoseringehalt des Zements dargestellt (siehe auch Tabelle 2). Eine deutliche Erhöhung gegenüber einem entsprechenden Zement (mit Kollagen I) ohne Phosphoserin (A0) ergibt sich für die Beispiele A1 bis A3 (2 mg bis 25 mg/g PS). Für A4 (50mg/g PS) kommt es erst nach etwa 30 Tagen Abbindens in SBF zu einer Oberflächenvergrößerung (siehe Tabelle 2), die aber auch wesentlich über der für den Zement ohne Phosphoserin ($48 \text{ m}^2/\text{g}$) liegt.

Für Strukturuntersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden Proben von den 4 Tage ausgehärteten Zementen auf Aluminiumträger präpariert und mit Kohlenstoff besputtert (Fig. 4). Aus Fig. 4 wird die Verfeinerung der Mikrostruktur durch den Phosphoserinzusatz (25 mg/g) in einem gemäß A3 hergestellten Knochenzement (Fig. 4B) im Vergleich zu dem entsprechenden gemäß A0 hergestellten Knochenzement (mit Kollagen I) ohne Phosphoserinzusatz (Fig. 4A) deutlich.

Die Ionenkonzentrationen in der den Zement umgebenden Lösung wurde bestimmt, indem während des Abbindeprozesses regelmäßig Proben der Lösung entnommen und bezüglich des pH-Wertes (Glaselektrode), Calcium- und Phosphatgehaltes (photometrische Methode) analysiert wurden. In Fig. 5 ist als Beispiel der Verlauf des pH- Wertes über die Zeit des Abbindens angegeben. Es wird deutlich, daß es keine Abweichungen in zell- und gewebeschädigende pH-Bereiche ($\text{pH} < 7$ und $\text{pH} > 8$) gibt. Die ermittelten Calcium- und Phosphationenkonzentrationen lagen ebenfalls auf für Zellen und Gewebe gut verträglichen Niveaus. Zum Vergleich werden Werte für den entsprechenden Knochenzement (mit Kollagen I) ohne Phosphoserinzusatz (A0) als „BioD/coll“ angegeben.

Für die Durchführung von Zellversuchen wird der Knochenzement in Form kleiner Plättchen (Durchmesser 15 mm, Höhe 1 bis 2 mm) hergestellt. Diese Plättchen werden nach Abbinden und Trocknen mit Gammastrahlung sterilisiert. Vor der Zellbesiedlung werden diese Plättchen im Zellkulturmedium (DMEM – Dulbecco - mit 10% fetalem Kälberserum) vorinkubiert und dann mit primären Ratten calvaria Osteoblasten ($12.500 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$) besiedelt. Um die Vitalität der Zellen in Abhängigkeit vom Phosphoseringehalt des Knochenzements zu testen, wurde ein MTT-Test ($\text{MTT} = 3\text{-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide}$) gemäß der Methode von T. Mosmann (J Immunol Methods 1983, 65: S. 55) durchgeführt. Die Zellen werden dazu 4 Stunden mit MTT inkubiert. Vitale Zellen bilden Formazankristalle, welche dann in einem Gemisch aus Isopropanol und HCl aufgelöst

werden. Die Formazan-Konzentration der Lösung wird photometrisch bei 570nm bestimmt. Anhand der Menge des von den Zellen gebildeten Formazans kann deren Vitalität eingeschätzt werden.

In Fig. 6 ist das Ergebnis des MTT- Tests (Vitalitätstest) dargestellt. Es wird deutlich, daß die Zellvitalität von Osteoblasten auf dem mit 50 mg/g Phosphoserin modifizierten Zement (A4) gegenüber der Zellvitalität der Osteoblasten auf dem Zement ohne Phosphoserin verbessert ist. Zum Vergleich werden Werte für den entsprechenden Knochenzement (mit Kollagen I) ohne Phosphoserinzusatz (A0) als „BioD/coll“ angegeben.

Ausführungsbeispiel 3:

Als Basiszement für einen Phosphoserin-haltigen Knochenzement wird Calcibon®, ein Calciumphosphatzement der Firma BIOMET Merck Biomaterials GmbH, verwendet. Zu 1000 mg dieses Basiszementes wird 25 mg O-Phospho-L-Serin zugemischt und sorgfältig vermengt (P1). Zum Vergleich wird Calcibon® ohne weitere Zusätze (P0) angemischt.

Die Mischungen (P0, P1) werden jeweils mit einem l/p-Verhältnis von 0,32 angemischt, wobei eine 4%ige wäßrige Dinatriumhydrogenphosphatlösung verwendet wird. Anschließend werden die pastösen Zementmischungen je nach weiterer Verwendung geformt. Die Bestimmung der Druckfestigkeit erfolgte entsprechend Ausführungsbeispiel 1.

Die Ergebnisse der für das Ausführungsbeispiel P1 und den Vergleichsversuch P0 ermittelten Werte für Druckfestigkeit (D) werden in der folgenden Tabelle (Tabelle 3) zusammengefasst:

Tabelle 3:

	P0	P1
Phosphoserin [/g Zement]	-	25 mg
D [Mpa]	37,96 ± 4	60 ± 7,27

Es wird eine signifikante Erhöhung der Festigkeit nach Zugabe von Phosphoserin deutlich.

Schutzansprüche:

1. Modifizierter Calciumphosphatzement auf Basis Tricalciumphosphat, Dicalciumphosphat (wasserfrei), Calciumcarbonat und gefällttem Hydroxylapatit, dadurch gekennzeichnet, daß der Calciumphosphatzement einen organischen Phosphatester der Orthophosphorsäure, vorzugsweise einen Monophosphatester, oder ein Salz eines organischen Phosphatesters enthält.
2. Calciumphosphatzement nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er den organischen Phosphatester in 0,5 bis 5 Masse-%, bevorzugt weniger als 3 Masse-%, enthält.
3. Calciumphosphatzement nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er Glycerophosphat enthält.
4. Calciumphosphatzement nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er Phosphoserin enthält.
5. Calciumphosphatzement nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Calciumphosphatzement als weitere Komponente mineralisiertes Kollagen I enthält.
6. Calciumphosphatzement nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß er 0,5 bis 5 Masse-%, bevorzugt 1 bis 2,5 Masse-%, mineralisiertes Kollagen I enthält.

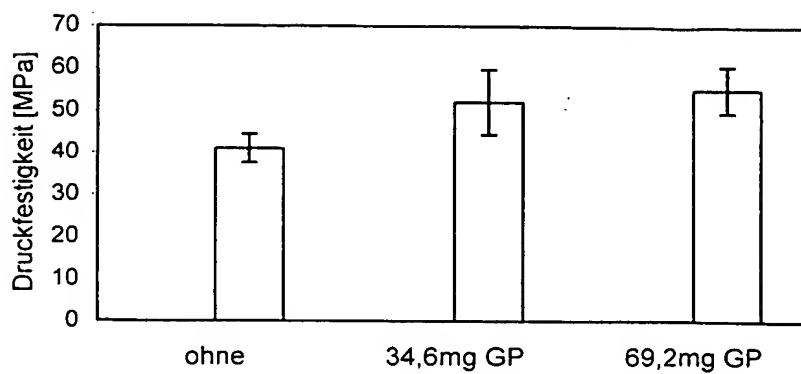


Fig. 1

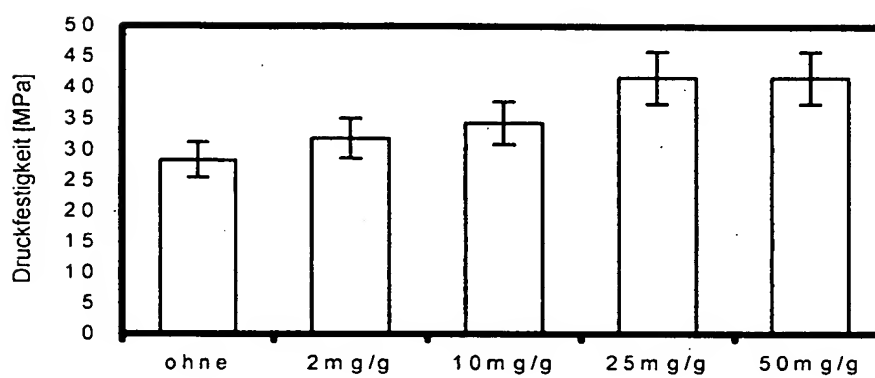


Fig. 2

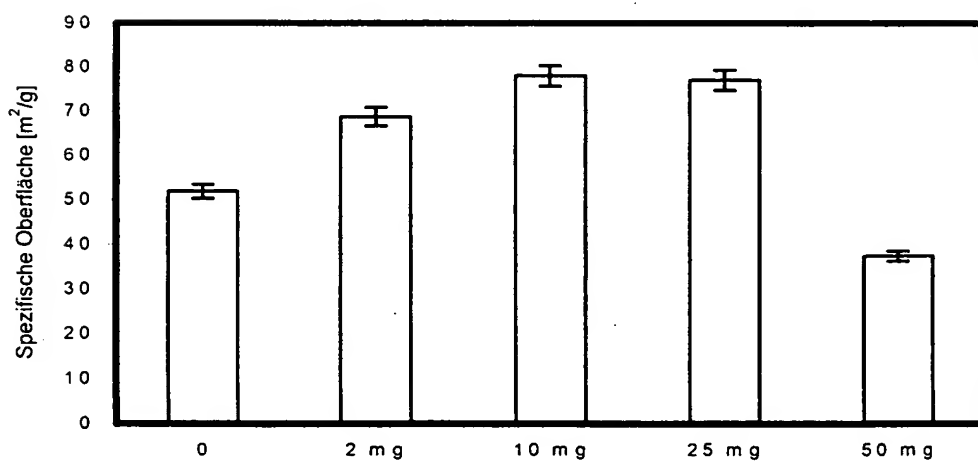


Fig. 3

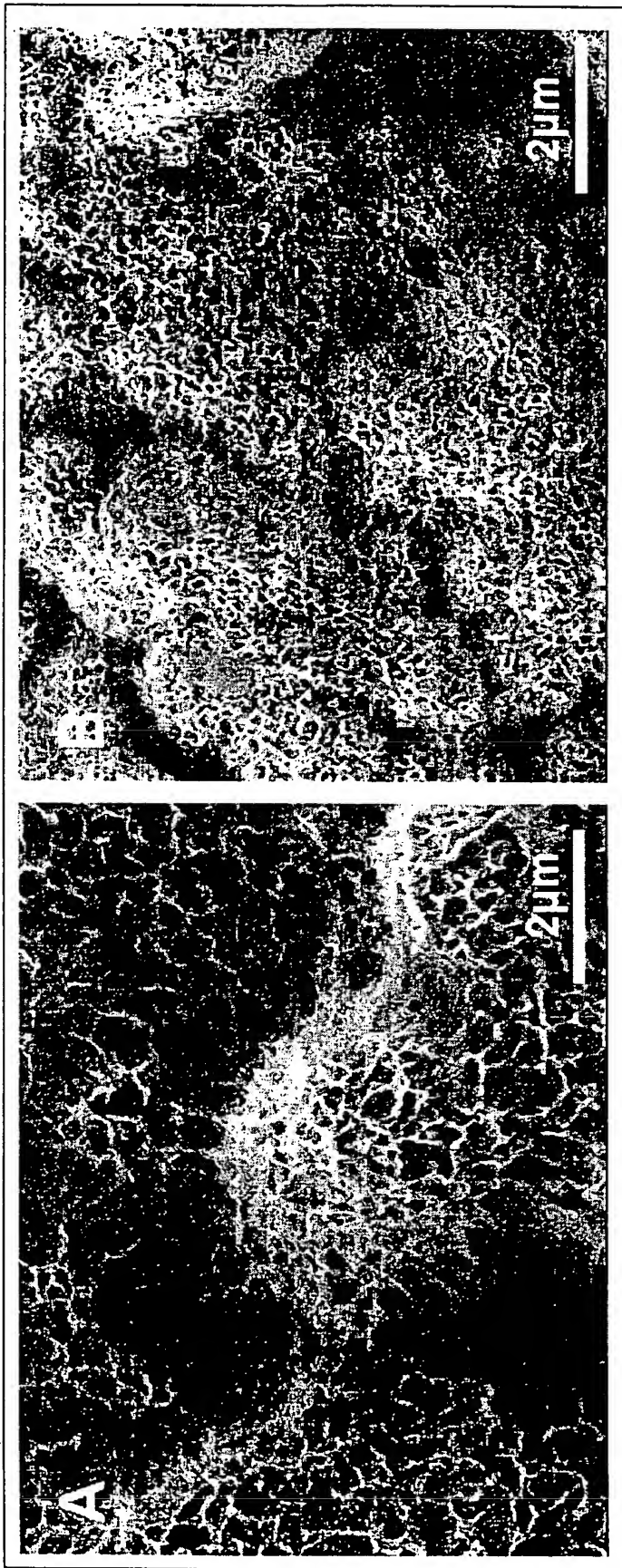


Fig. 4

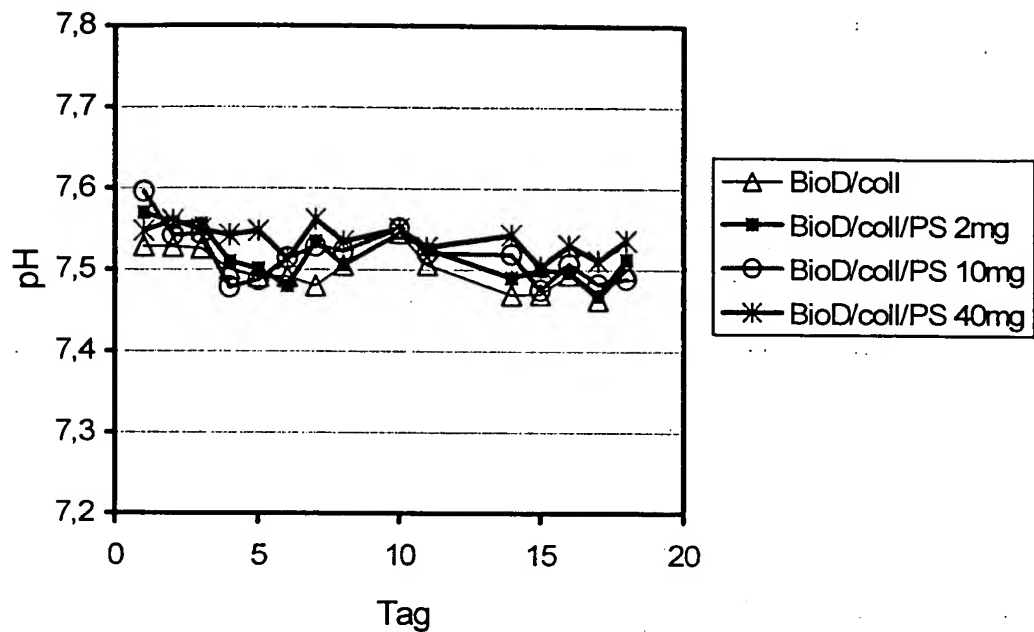


Fig. 5

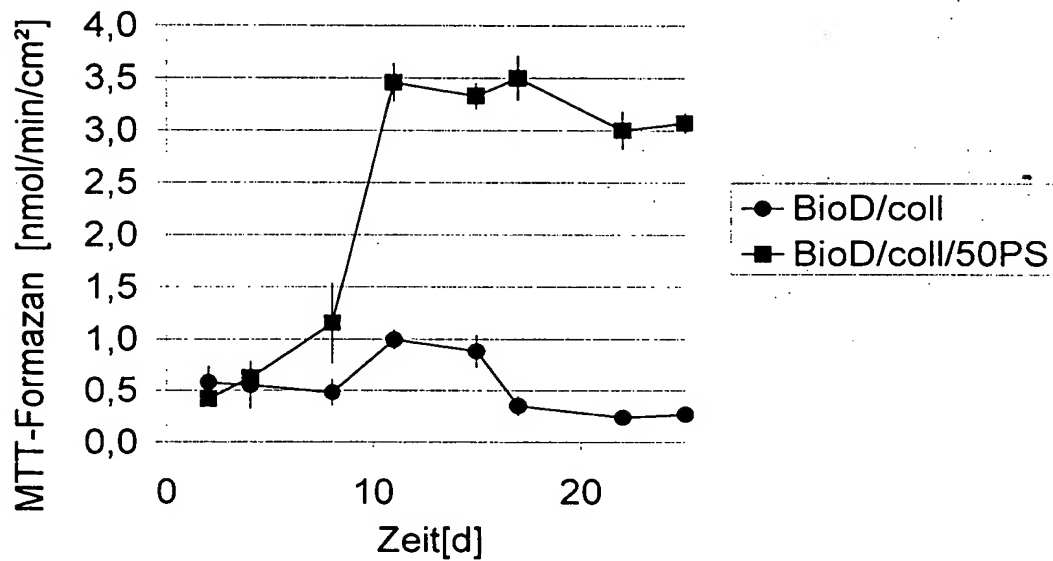


Fig. 6